

BUNDE REPUBLIK DEU SCHLAND:

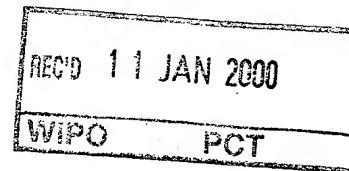
29 Feb 00
319

EP 99/5890



GU

09/762782
Bescheinigung



Herr Professor Dr. Thomas Rausch in Heidelberg/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

„Transgene Pflanzen und Pflanzenzellen mit verminderter Expression von Invertaseinhibitoren“

am 12. August 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole A 01 H und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 19. November 1999
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Wehner

Wehner

Aktenzeichen: 198 36 405.9

A 9161
06.90
11/98

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Transgene Pflanzen und Pflanzenzellen mit verminderter Expression von Invertaseinhibitoren

Die vorliegende Erfindung beschreibt transgene Pflanzenzellen und Pflanzen sowie ein Verfahren für die Bereitstellung von Invertaseinhibitor-cDNA-Sequenzen in antisense-Orientierung.

Verbesserung von Qualität und/oder Quantität pflanzlicher Reservestoffe in Samen dikotyler und monokotyler landwirtschaftlicher Nutzpflanzen stellen wichtige Ziele biotechnologischer Forschung dar. In der Regel wurden bisher Strategien entwickelt, die auf der Einführung bestimmter Gene basieren, deren Genprodukte Enzyme darstellen, die an der Synthese des Reservestoffes selbst (z.B. ADP-Glucosepyrophosphorylase) beteiligt sind. Des Weiteren wurden aber auch Verfahren beschrieben, in denen durch veränderte Expression von heterologen und damit deregulierten Invertasen bzw. Glucokininasen im Cytosol eine erhöhte Glykolyserate erreicht wird (DE-A1-195 29 696). In letzterer Variante führt die erhöhte Spaltung von Saccharose durch eine deregulierte pilzliche Invertase in Kombination mit einer deregulierten bakteriellen Glucokinase zu einer verstärkten Glykolyserate. Dieser Ansatz beruht auf der Annahme, daß auf Grund der erhöhten Konzentrationen an Intermediaten der Glykolyse die Synthese von Speicherölen in Samen stimuliert wird, da die Metabolisierung des primären Photoassimilats Saccharose zu phosphorylierten Hexosen bzw. den Fettsäurevorstufen Pyruvat und Acetyl-CoA gefördert wird.

Die DE-A1-195 29 696 beschreibt demgemäß die Einführung eines artfremden, zum Beispiel pilzlichen Gens zur Expression der Invertase. Dieses pilzliche Invertase-Enzym, das artfremd ist und deshalb keiner Regulation unterliegt, wird aufgrund der Zuführung des fremden Gens unter der Regulation eines geeigneten Promoters verstärkt gebildet, wodurch der von der Invertase katalysierte Abbau der Saccharose in Glukose und Fructose beschleunigt erfolgt. Die mit höherer Geschwindigkeit erfolgende Bildung der Glukose soll letztendlich eine beschleunigte Produktion von pflanzlichen Speicherstoffen bewirken. Dieses Verfahren beruht auf einem Eingriff in den Metabolismus in der Zelle des Samenspeichergewebes,

wobei der Assimilattransfer zwischen maternalem und Samengewebe nur indirekt beeinflußt wird.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, transgene Pflanzenzellen und Pflanzen bereitzustellen, die während der Samenentwicklung in den Samen mehr pflanzliche Speicherstoffe (Kohlenhydrate, Fette, Proteine) bilden als entsprechende nicht transformierte Pflanzen, ohne daß artfremde Gene eingesetzt werden.

Die Lösung dieser Aufgabe ist dann erfindungsgemäß eine transgene Pflanzenzelle, bei der im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzenzellen aufgrund verminderter Expression von Invertaseinhibitoren eine erhöhte Aktivität der Zellwand-Invertase vorliegt, wobei diese verminderte Expression durch Einführung einer der gleichen Pflanzenart entsprechenden (homologen) und unter Regulation eines Promotors stehenden Invertaseinhibitor-cDNA in *antisense*-Orientierung ausgelöst wird.

Erfindungsgemäß wird auch ein Verfahren zur Gewinnung von Invertaseinhibitor-cDNA-Sequenzen in *antisense*-Orientierung bereitgestellt, wobei dieses - unabhängig von der jeweiligen Spezies - folgende Schritte enthält:

- a) Gewinnung einer Inhibitorproteinfraktion aus der Zellwandprotein-Fraktion einer entsprechenden Zellsuspensionskultur
- b) Gewinnung von entsprechenden Peptidsequenzen nach Spaltung und Reinigung der entstandenen Peptide
- c) Klonierung von zunächst partieller und in der Folge Vollängen-cDNA für das Invertaseinhibitorprotein aus einer cDNA-Bank
- d) Klonierung der Invertaseinhibitor cDNA in *antisense*-Orientierung in einen binären Vektor
- e) Transformation der Pflanzenspezies mit dem *antisense*-Genkonstrukt

Der Assimilattransfer zwischen maternalem Gewebe und Samengewebe ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Bildung der pflanzlichen Speicherstoffe im Samen. Wird dieser Schritt durch die Erhöhung der Aktivität der in der Übergangszone exprimierten Zellwand-Invertase beschleunigt, so kommt es in Folge des verstärkten Assimilattransfers (die erhöhte Aktivität der Zellwand-Invertase bewirkt eine Steigerung des Assimilattransfers zwischen maternalem und Samengewebe) zu einer erhöhten Akkumulation des Hauptspeicherstoffs der jeweiligen Pflanzenspezies (Stärke, Fett, Protein).

Im Gegensatz zu allen bisherigen Verfahren beruht daher die hier beschriebene Erfindung auf der Regulation spezifischer, während der Samenentwicklung exprimierter Zellwand-Invertase-Isoformen. Die Invertaseinhibitor-cDNA codiert eine apoplastische Variante des Invertaseinhibitors. Durch Einführung einer einzigen der gleichen Art entsprechenden cDNA-Sequenz wird der für den Assimilattransfer entscheidende Schritt der Saccharosespaltung am natürlichen Wirkungsort beeinflußt. Die Beobachtung, daß die Einführung einer einzigen Sequenz, das heißt einer Invertaseinhibitor-cDNA in *antisense*-Orientierung unter der Steuerung des konstitutiven CaMV35S-Promotors oder eines gewebespezifischen Promotors die gesamte vegetative Pflanzenentwicklung nicht beeinflußt, sondern nur während der Samenentwicklung zu einer spezifischen Deregulierung führt, ist überraschend und zeigt die extrem hohe Spezifität des transgenen Eingriffs. Die Vorteile dieser direkten Deregulierung sind offensichtlich:

- Es genügt ein einziges Genkonstrukt, um eine Erhöhung der Reservestoffakkumulation zu erreichen.
- Es werden keine artfremden Genprodukte (Eiweiße) gebildet.
- Der Eingriff im Metabolismus ist hochgradig spezifisch.
- Für Tabak wird exemplarisch gezeigt, daß die veränderte Expression eines apoplastischen Invertaseinhibitors zu drastischen Änderungen der Speicherölbildung führt.

Die Erhöhung der Akkumulation der Samenspeicherstoffe durch eine verminderte Expression des Invertaseinhibitors beruht unter anderem auf folgenden Mechanismen:

- A) Durch die Veränderung der Aktivitätsphase der Zellwand-Invertase im maternalen Gewebe wird die Effizienz der Nährstoffentladung beeinflußt, das heißt in Inhibitor-*antisense*-Transformanten erhöht.
- B) Für die Synthese von Reserveölen des Samens ist der oxidative Pentosephosphatzzyklus von entscheidender Bedeutung. Die anhaltend erhöhte Bereitstellung von Glucose in Inhibitor-*antisense*-Transformanten fördert daher die Speicherölsynthese.
- C) Durch die Veränderung des Verhältnisses von Hexosen zu Saccharose wird die Zellteilungsphase der Samenentwicklung beeinflußt. Durch eine Verlängerung der Aktivitätsphase der Zellwand-Invertase in Inhibitor-*antisense*-Transformanten wird zum Beispiel die Zellzahl pro Samen erhöht.

Im Vergleich zur ebenso möglichen Überexpression der am Assimilattransfer beteiligten Zellwand-Invertase(n) hat der hier beschriebene indirekte Ansatz einer Ausschaltung der Invertaseinhibitoren noch weitere Vorteile. Die im Verlauf der Samenbildung exprimierten Zellwand-Invertasen werden bereits natürlicherweise stark exprimiert. Das Ausmaß einer zusätzlichen Induktion durch Einsatz starker Promotoren ist daher begrenzt, wohingegen durch *antisense*-Ausschaltung des Inhibitors eine starke Erhöhung der Zellwand-Invertase(n) erreicht werden kann. Zwar könnte durch Expression einer heterologen, deregulierten, inhibitorinsensitiven Invertase mit Signalpeptid für die Zielsteuerung in den Zellwandraum möglicherweise ein ähnlicher Effekt erreicht werden, doch müssen in diesem Fall artfremde Proteine eingesetzt werden. Außerdem besteht bei einer Kombination der für diesen Ansatz notwendigen samenspezifischen Promotoren mit einer deregulierten Invertase die große Gefahr, daß eine zu hohe Expression zu unerwünschten Nebenwirkungen führt. Im Gegensatz hierzu wird beim hier beschriebenen Verfahren die maximale Aktivität der natürlicherweise vorkommenden Zellwand-Invertasen nie überschritten, es wird lediglich die Zeitspanne ihrer Aktivität während der Reservestoffakkumulation ausgedehnt. Aus diesen Gründen ist die indirekte Regulation der Zellwand-Invertasen über *antisense*-Expression von

Invertaseinhibitoren in jedem Falle der Einführung einer heterologen Invertase vorzuziehen und stellt eine bedeutsame technische Verbesserung dar.

Die wichtige Rolle von Zellwand-Invertasen für die Entwicklung stärke- und proteinreicher Samen ist bekannt. So wird z.B. die Stärkeakkumulation in Maissamen bei verminderter Expression einer Zellwand-Invertase durch Störung des Assimilattransfers zwischen Pedicel und Endosperm gestört. Für verschiedene Pflanzenspezies sind blütenpezifische Zellwand-Invertase-Isoformen bekannt. Für *Nicotiana tabacum* konnte gezeigt werden, daß ein apoplastischer Invertaseinhibitor besonders während der Entwicklung der Samen stark exprimiert wird. Basierend auf diesen Beobachtungen und der Analyse transgener Tabakpflanzen mit veränderter Expression eines apoplastischen Invertaseinhibitors wird in der vorliegenden Erfindung unter anderem ein Verfahren beschrieben, gemäß dem transgene Pflanzenzellen bzw. Pflanzen generiert werden, bei denen die Expression von Invertaseinhibitorproteinen während der Samenentwicklung vermindert wird. Das Verfahren läßt sich auf verschiedene dikotyle und monokotyle Nutzpflanzen anwenden. Hierzu zählen z.B. folgende agrarwirtschaftlich bedeutsame Arten:

Fettspeichernde Samen: Insbesondere Raps, Sonnenblume, Erdnuß, Ölpalme, Sojabohne

Stärkesspeichernde Samen: Insbesondere Mais, Reis, Weizen, Gerste, Hafer, Roggen

Proteinspeichernde Samen: Insbesondere Sojabohne, Erbse

Die enthaltenen Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung transgener Pflanzen mit verminderter Expression eines Invertaseinhibitors sollen im folgenden erläutert werden:

Methoden zur Gewinnung einer homogenen Inhibitorproteinfraktion aus der apoplastischen Zellwandprotein-Faktion einer Zellsuspensionskultur

Von der jeweiligen Pflanzenspezies wird eine Zellsuspensionskultur angelegt. Die Verfahren zur Gewinnung einer Zellkultur folgen Standardprotokollen der pflanzlichen Gewebekultur. In der Regel werden die Zellen unter sterilen Bedingungen in einem komplexen Nährmedium unter Zusatz von Saccharose (Kohlenstoffquelle) als Schüttelkultur angezogen. Unter diesen

Anzuchtbedingungen exprimieren pflanzliche Zellen eine Zellwand-Invertase, die durch einen ebenfalls exprimierten Invertaseinhibitor reguliert wird.

Die Anreicherung und Reinigung des Invertaseinhibitors basiert auf dessen Bindung an die Zellwandinvertase. Zunächst wird eine Zellwandproteinfraktion durch Inkubation in 1 M NaCl, 1 mM PMSF bei 4°C unter Schütteln extrahiert. Hierbei werden in der Regel keine cytosolischen Proteine extrahiert. Die so gewonnene Zellwandproteinfraktion wird über Ammoniumsulfatfällung (80%) bzw. über Membranfiltration konzentriert. Durch anschließende Chromatographie an einer Concanavalin A-Säule wird eine Glykoproteinfraktion gewonnen, die die glykosyierte Zellwand-Invertase und den an diese gebundenen Invertaseinhibitor enthält. SDS-PAGE/Western blot-Analysen der so gewonnenen Zellwand-Invertase- und damit Invertaseinhibitor-angereicherten Fraktionen mit einem polyklonalen Antiserum gegen den Invertaseinhibitor aus Tabakzellen zeigen die Präsenz von Invertaseinhibitoren, in der Regel Protein von 15-25 kDa, an.

Die Fig. 1 zeigt dazu den Nachweis von zum Tabak-Invertaseinhibitor homologen Invertaseinhibitoren anderer Pflanzenarten - eine Western Blot Analyse von aus Suspensionskulturen von *Chenopodium rubrum* (1) und *Daucus carota* (2) gewonnenen Zellwandprotein-Proben. Die Entwicklung wurde mit einem gegen den rekombinanten Tabak-Invertaseinhibitor gewonnenen Antiserum vorgenommen. Für beide Spezies wurden Invertaseinhibitor-Polypeptide von ca. 17 kDa detektiert.

Die weitere Reinigung der Komplexe aus Zellwand-Invertase und Invertaseinhibitor erfolgt über Ionenaustauscherchromatographie an einem Kationenaustauscher, z.B. Sulfopropylsephadex. Nach sequentieller Chromatographie, zunächst über einen pH-Gradienten (pH 8-12), danach über einen NaCl-Gradienten, wird eine stark angereicherte Präparation der Zellwand-Invertase gewonnen, wobei der Invertaseinhibitor im stabilen Komplex mit letzterer vorliegt. Die Peak-Fraktionen der letzten Ionenaustauscherreinigung werden über SDS-PAGE/Western blot-Analyse auf Zellwand-Invertase hin detektiert, z.B. mit einem Antiserum gegen die Karotten-Zellwand-Invertase. Außerdem werden die Invertase-Aktivitäten aller Fraktionen im gekoppelten enzymatischen Test mit Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase ermittelt. Die Fraktionen mit starkem Zellwand-Invertase-

Immunosignal aber geringer Invertaseaktivität enthalten das in der Regel hochreine Inhibitorprotein.

Methoden zur Gewinnung von Peptidsequenzen der gereinigten Invertaseinhibitoren

In der Regel liegt das Inhibitorprotein nach dem oben beschriebenen Reinigungsprotokoll ausreichend rein vor, um nach Elektroblot auf eine PMDF-Membran direkt N-terminal ansequenziert zu werden. Nach Gewinnung von 100-500 µg Inhibitorprotein kann dieses gegebenenfalls erneut über SDS-PAGE gereinigt und anschließend direkt im Gel tryptisch verdaut werden. Die Trennung der entstehenden Peptide über reverse phase-HPLC und deren anschließende Sequenzierung über Edmann-Abbau entspricht Standardverfahren. Die Kombination von N-terminaler Ansequenzierung und der Sequenzierung der beim tryptischen Verdau erhaltenen Peptide führt in der Regel zu ausreichender Sequenzinformation für eine auf dem RT-PCR-Verfahren basierende Klonierung.

Verfahren zur Klonierung von zunächst partiellen und in der Folge Vollängen-cDNAs für das jeweilige Invertaseinhibitorprotein aus einer cDNA-Bank

Ausgehend von den erhaltenen Peptidsequenzinformationen werden gemäß dem genetischen Kode Primersequenzen abgeleitet. Für das optimale Primerdesign werden Standardalgorithmen benutzt. In einer anderen Ausführung werden Primer an Hand hochkonservierter Sequenzbereiche der bereits bekannten Invertaseinhibitorsequenzen aus *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum*, *Arabidopsis thaliana* und *Citrus inshui* entworfen.

Zunächst wird eine 1.Strang cDNA-Synthese nach Standardverfahren durchgeführt. Hierfür wird Gesamt-RNA aus einer Zellsuspensionskultur, bzw. in einer anderen Ausführung aus Blüten mit jungen Samenanlagen nach Standardverfahren extrahiert. Über RT-PCR wird dann zunächst eine partielle Invertaseinhibitor-cDNA amplifiziert. Das Amplifikat wird in einer Ausführung in den Blueskript-Vektor kloniert. Nach Sequenzierung und Bestätigung einer zu den bereits bekannten Invertaseinhibitoren homologen Sequenz wird diese partielle cDNA als Sonde für die Gewinnung von Vollängenklonen eingesetzt. Hierfür wird nach Standardverfahren entweder einer cDNA-Bank aus einer Zellsuspensionskultur oder in einer anderen Ausführung eine cDNA aus Blüten mit jungen Samenanlagen angelegt.

Klonierung der Invertaseinhibitor cDNA in sense- bzw. antisense-Orientierung in einen binären Vektor

Die für jede Pflanzenart klonierte Invertaseinhibitor-cDNA wird in einer Ausführungsform in antisense-Orientierung in den binären Vektor BinAR (Bin19 Derivat) kloniert.

Fig. 2 zeigt den binären Vektor (BinAR) zur *Agrobakterium tumefaciens*-vermittelten Transformation. Die kodierenden Regionen der Invertaseinhibitor-cDNAs werden in *sense*- oder *antisense*-Orientierung in die 'multiple cloning site' kloniert.

In einer Ausführungsform wird der CaMV35S-Promotor verwendet, doch können gegebenenfalls auch andere, gewebespezifische Promotoren verwendet werden.

Transformation der jeweiligen Pflanzenspezies mit den antisense-Genkonstrukten

Für die meisten dikotylen Nutzpflanzen werden Invertaseinhibitor-*antisense*-Transformanten unter Einsatz der *Acrobakterium tumefaciens*-vermittelten Transformation (Standardverfahren) gewonnen. Es wird demgemäß ein Acrobakterium eingesetzt, das rekombinante DNA-Moleküle enthält, die Invertaseinhibitor-cDNA in *antisense*-Orientierung, kloniert hinter dem Promotor, aufweisen. Hierbei werden in einer für viele Pflanzenarten einsetzbaren Ausführungsform Blattstücke transformiert, wobei aus den rekombinanten Zellen auf Antibiotikum-haltigen Medium Primärtransformanten regeneriert werden. Die tatsächlich gewählte Transformationstechnik ist abhängig von der Pflanzenart.

Durch Regeneration einer transformierten Pflanzenzelle wird eine transgene Pflanze gewonnen.

Der Einfluß der veränderten Expression eines apoplastischen Invertaseinhibitors in *Nicotiana tabacum* wird im folgenden beschrieben:

Tabak (*Nicotiana tabacum*) wurde mit der cDNA des apoplastischen Tabak-Invertaseinhibitors in *antisense*-Orientierung transformiert (*Acrobakterium tumefaciens*-vermittelte Transformation, BinAR-Vektor, CaMV35S-Promotor; Blattscheiben-Transformation gemäß Standardverfahren). Primärtransformanten wurden zunächst über Gewebekultur zu Pflanzen regeneriert und anschließend im Gewächshaus zur Blüte gebracht. Die Samen der Primärtransformanten wurden auf Kanamycin-haltigem Medium ausgesät. Nach steriler Voranzucht wurden die Pflanzen der F1-Generation im Gewächshaus zur Blüte gebracht. Nach Bestäubung wurden in regelmäßigen Zeitabständen die Zellwand-Invertase-Aktivitäten in den Ovarien bestimmt.

Die Fig. 3 zeigt Zellwand-Invertase-Aktivitäten im Ovar von Tabak-Wildtyp (SNN), einer repräsentativen Inhibitor-*antisense*-Transformante (as16) und einer repräsentativen Inhibitor-*sense*-Transformante (s9) im Verlauf der frühen Samenentwicklung (0-14 Tage nach Befruchtung). Auf der Ordinate sind die Aktivitäten g in mmol Glucose/g Frischgewicht/min angegeben; auf der Abszisse die Zeit t in Tagen.

Die Menge an Invertaseinhibitor-Protein wurde über Western Blot-Analyse ermittelt. Fig. 4 zeigt diesbezüglich den Nachweis der selektiven Reduktion (*antisense*-Transformante) bzw. Zunahme (*sense*-Transformante) des Invertaseinhibitor-Polypeptids in Stamina und Ovar, nachgewiesen mit einem gegen den rekombinanten Tabak-Invertaseinhibitor gerichteten Antiserum (*Sense*-Transformante (s9): 1, Ovar; 2, Stamina. *Antisense*-Transformante: 3, Ovar; 4, Stamina. Wildtyp (SNN): 5, Ovar; 6, Stamina). Es wurden über Concanavalin A-Chromatographie gereinigte Proben aufgetragen, in denen nur an Zellwand-Invertase gebundener Inhibitor enthalten ist.

Nach Reifung der Samen wurden deren Trockengewichte bestimmt, sowie die Menge an Speicheröl und Gesamtprotein.

Die Messung der Zellwand-Invertase-Aktivitäten während der frühen Samenentwicklung (Fig. 3) zeigt zunächst für den Wildtyp eine ca. 6-fache Steigerung zwischen dem 6. und 12. Tag nach Bestäubung. Dieser Zeitraum entspricht der späten Zellteilungsphase und dem Beginn der Speicherphase. Die Western Blot-Analyse zeigt, daß im Ovar die Menge an Invertaseinhibitor-Polypeptid in *antisense*-Transformanten stark vermindert, in *sense*-

Transformanten hingegen stark erhöht ist (Fig.4). Im Unterschied hierzu wirkt sich die veränderte Inhibitorexpression in Stamina nur geringfügig aus, vermutlich weil in diesem Gewebe mehrere Inhibitor-Isoformen exprimiert werden.

Die veränderte Aktivität der Zellwand-Invertase während der Samenentwicklung wirkt sich aus auf das Trockengewicht/Samen (Tabelle 1), den Gehalt an Speicheröl/Samen (Tabelle 2) und den Gesamtproteingehalt/Samen (Tabelle 3), nicht jedoch auf die Gesamtzahl an Samen pro Blüte und auch nicht auf die Samengröße.

Tabelle 1

Trockengewichte pro Samen in Tabak-Wildtyp (SNN), in zwei repräsentativen Inhibitor-*antisense*-Transformanten (s9, s10) und in zwei repräsentativen Inhibitor-*sense*-Transformanten (as16, as43).

Tabak-Linie	µg Trockengewicht/Samen	Prozent vom Wildtyp (SNN)
WT (SNN)	64 ± 2	100
s9	42 ± 2	66
s10	52 ± 2	81
as16	71 ± 1	110
as43	86 ± 4	134

Tabelle 2

Samenöl-Gehalte pro Samen in Tabak-Wildtyp (SNN), in zwei repräsentativen Inhibitor-*antisense*-Transformanten (s9, s10) und in zwei repräsentativen Inhibitor-*sense*-Transformanten (as16, as43).

Tabak-Linie	µg Gesamtöl/Samen	Prozent vom Wildtyp (SNN)
WT (SNN)	23	100
s9	10	43
s10	16	69
as16	28	122
as43	39	170

Tabelle 3

Gesamtprotein pro Samen in Tabak-Wildtyp (SNN), in zwei repräsentativen Inhibitor-*antisense*-Transformanten (s9, s10) und in zwei repräsentativen Inhibitor-*sense*-Transformanten (as16, as43).

Tabak-Linie	µg Gesamtprotein/Samen	Prozent vom Wildtyp (SNN)
WT (SNN)	7.4	100
s9	5.5	74
s10	5.7	77
as16	7.8	105
as43	9.9	134

Die starke Erhöhung des Speicherölgehaltes in zwei unabhängigen *antisense*-Transformanten (+22 % bzw. +70 %) korreliert mit Zunahmen an Gesamtprotein und Samengewicht, wobei die Zunahme für Speicheröl am stärksten ausgeprägt ist. Bemerkenswerterweise korreliert die Zunahme der Zellwand-Invertase-Aktivität im Ovar während der Samenentwicklung mit der Phase der maximalen Akkumulation von Speicheröl.

Die gesamte vegetative Entwicklungsphase Phase der Inhibitor-*antisense*- und Inhibitor-*sense*-Transformanten verläuft ohne sichtbaren Phänotyp, mit Ausnahme des Keimungsvorganges. Hier zeigt sich zwischen der Keimung von Tabak-Wildtyp-Samen und Invertaseinhibitor-*antisense*-Samen kein Unterschied, wohingegen es bei Samen von Invertaseinhibitor-*sense*-Transformanten zu einer signifikanten Verzögerung der Keimung kommt.

Fig. 5 zeigt das Keimungsverhalten von Samen des Tabak-Wildtyps (SNN), von Invertaseinhibitor-*antisense*-Transformanten (INHas) und von Invertaseinhibitor-*sense*-Transformanten. Auf der Abszisse ist die Zeit t' in Tagen nach der Aussaat; auf der Ordinate die Keimungsrate d in % aufgetragen. Pro Linie wurden unter sterilen Bedingungen jeweils 40 Samen auf ein LS-Medium (0.5% Saccharose, pH 5.6) ausgesät. Das Hervortreten der Radicula diente als Kriterium für die Keimung.

Ein weiteres Anwendungsbeispiel der vorliegenden Erfindung ist die Einführung eines Invertaseinhibitor-*antisense*-Konstruktes in Raps (*Brassica napus*). Raps enthält auf Samenbasis eine dem Tabak vergleichbare Menge an Speicheröl. Das Ergebnis einer Invertaseinhibitor-*antisense*-Transformation ist eine Erhöhung des Speicherölgehaltes um mindestens 20%, gegebenenfalls aber um bis zu 70%.

Eine weitere Anwendung mit dem gleichen Ziel, nämlich der Erhöhung des Speicheröl-Gehaltes, ist die Transformation der Sonnenblume, der Ölpalme oder der Sojabohne mit einem Invertaseinhibitor-*antisense*-Konstrukt (Bereitstellung transgener, ölspeichernder Pflanzen dieser Spezies).

In einer weiteren Ausführungsform wird durch die Einbringung von Invertaseinhibitor-*antisense*-Konstrukten in Mais, Reis, Weizen, Hafer, Gerste und Roggen die Menge an Samen-Speicherstärke erhöht. Es können also transgene Pflanzenzellen oder Pflanzen, die Stärke speichern, bereitgestellt werden. Für proteinreiche Samen, z.B. Sojabohne und Erbse, wird in einer weiteren Ausführungsform durch Einführung von Invertaseinhibitor-*antisense*-Konstrukten die Gesamtmenge an Speicherprotein erhöht.

In einer weiteren Ausführungsform wird durch die Einführung von Invertaseinhibitor-*antisense*-Konstrukten bzw. durch die daraus resultierende verbesserte Speicherstoffakkumulation die Keimfähigkeit von Samen einer Nutzpflanze erhöht.

Die Bereitstellung transgener Pflanzenzellen oder Pflanzen bezieht sich bevorzugt auf Nutzpflanzen.

Patentansprüche

1. Transgene Pflanzenzelle, bei der im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzenzellen aufgrund verminderter Expression von Invertaseinhibitoren eine erhöhte Aktivität der Zellwand-Invertase vorliegt, wobei diese verminderte Expression durch Einführung einer der gleichen Pflanzenart entsprechenden (homologen) und unter Regulation eines Promotors stehenden Invertaseinhibitor-cDNA in *antisense*-Orientierung ausgelöst wird.
2. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die erhöhte Aktivität der Zellwand-Invertase eine Steigerung des Assimilattransfers zwischen maternalem und Samengewebe bewirkt.
3. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Invertaseinhibitor-cDNA eine apoplastische Variante des Invertaseinhibitors codiert.
4. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Promotor ein CaMV35S-Promotor oder ein gewebespezifischer Promotor ist.
5. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, die eine Zelle einer Nutzpflanze ist.
6. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 5, die eine Zelle einer ölspeichernden Pflanze ist.
7. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 5 oder 6, die eine Zelle einer Rapspflanze, Sojabohnenpflanze, Sonnenblumenpflanze, oder Ölpalme ist.
8. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 5, die eine Zelle einer stärkespeichernden Pflanze ist.
9. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 5 oder 8, die eine Zelle einer Reis-, Mais-, Roggen-, Weizen-, Hafer-, oder Gerstepflanze ist.

10. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 9, die durch Regeneration einer Pflanzenzelle gewonnen wird.

11. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüchen 1 bis 10, die gegenüber der entsprechenden nichttransformierten Pflanze während der Samenentwicklung mehr Speicheröl, Speicherstärke oder Speicherprotein bildet.

12. Verfahren zur Gewinnung von Invertaseinhibitor-cDNA-Sequenzen in *antisense*-Orientierung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 enthaltend folgende Schritte:

a) Gewinnung einer Inhibitorproteinfraktion aus der Zellwandprotein-Fraktion einer entsprechenden Zellsuspensionskultur

b) Gewinnung von entsprechenden Peptidsequenzen nach Spaltung und Reinigung der entstandenen Peptide

c) Klonierung von zunächst partieller und in der Folge Vollängen-cDNA für das Invertaseinhibitorprotein aus einer cDNA-Bank

d) Klonierung der Invertaseinhibitor cDNA in *antisense*-Orientierung in einen binären Vektor

e) Transformation der Pflanzenspezies mit dem *antisense*-Genkonstrukt

13. Verfahren zur Gewinnung von Invertaseinhibitor-cDNA-Sequenzen in *antisense*-Orientierung nach Anspruch 12, wobei zur Durchführung von Schritt e) ein Acrobakterium eingesetzt wird, das rekombinante DNA-Moleküle enthält, die Invertaseinhibitor-cDNA in *antisense*-Orientierung, kloniert hinter dem Promotor, aufweisen.

Zusammenfassung

Es werden transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit reduzierter Expression von Invertaseinhibitoren beschrieben. Die Veränderung der Expression der Invertaseinhibitoren wird durch Einführung einer cDNA-Sequenz *antisense*-Orientierung erreicht. Die Expression der *antisense*-DNA-Sequenzen erfolgt entweder unter der Regulation des CaMV35S-Promotors oder gewebespezifischer Promotoren. Da im Verlauf der Samenentwicklung dikotyler und monokotyler Pflanzen der Transfer von Assimilaten aus dem maternalen in das Samengewebe durch Zellwand-Invertasen gesteuert wird, führt die reduzierte Expression von Invertaseinhibitoren zu einer Erhöhung des Assimilattransfers. Am Beispiel des Tabak, einer Spezies mit ca. 40% Speicheröl im Samen, wird gezeigt, daß die reduzierte Expression eines Invertaseinhibitors zu einer signifikanten Erhöhung des Gehaltes an Speicheröl führt. Anwendungsbeispiele für die Erhöhung bzw. Verminderung von Samenölen bzw. Samenstärke werden beschrieben.

09.12.99

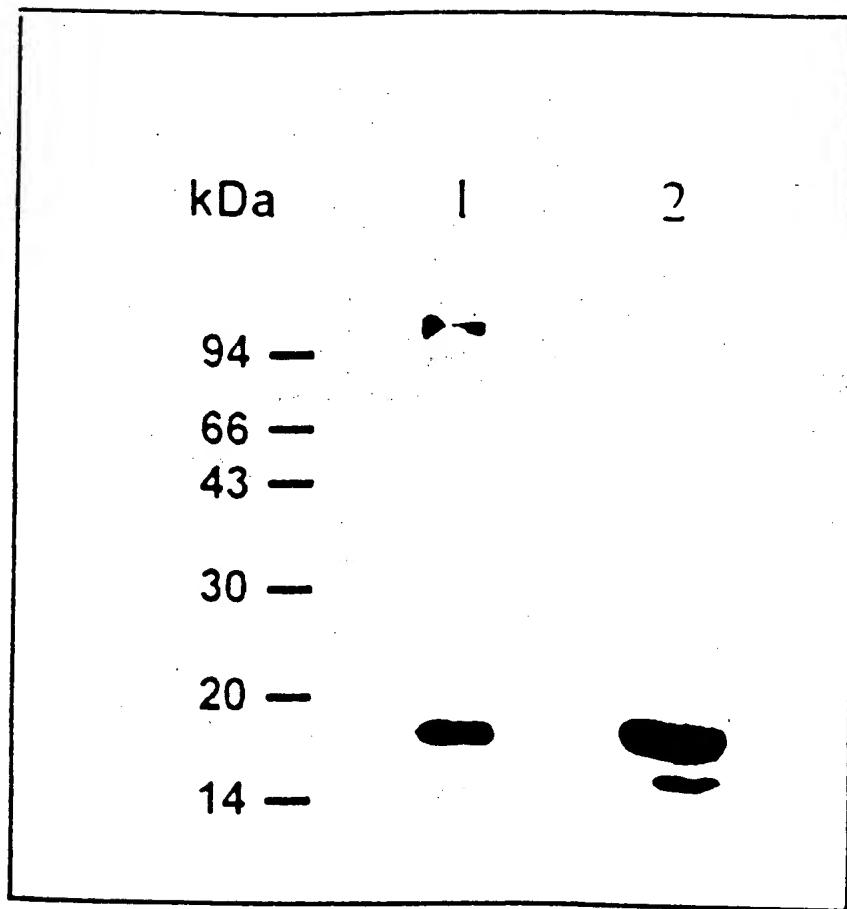


Fig. 1

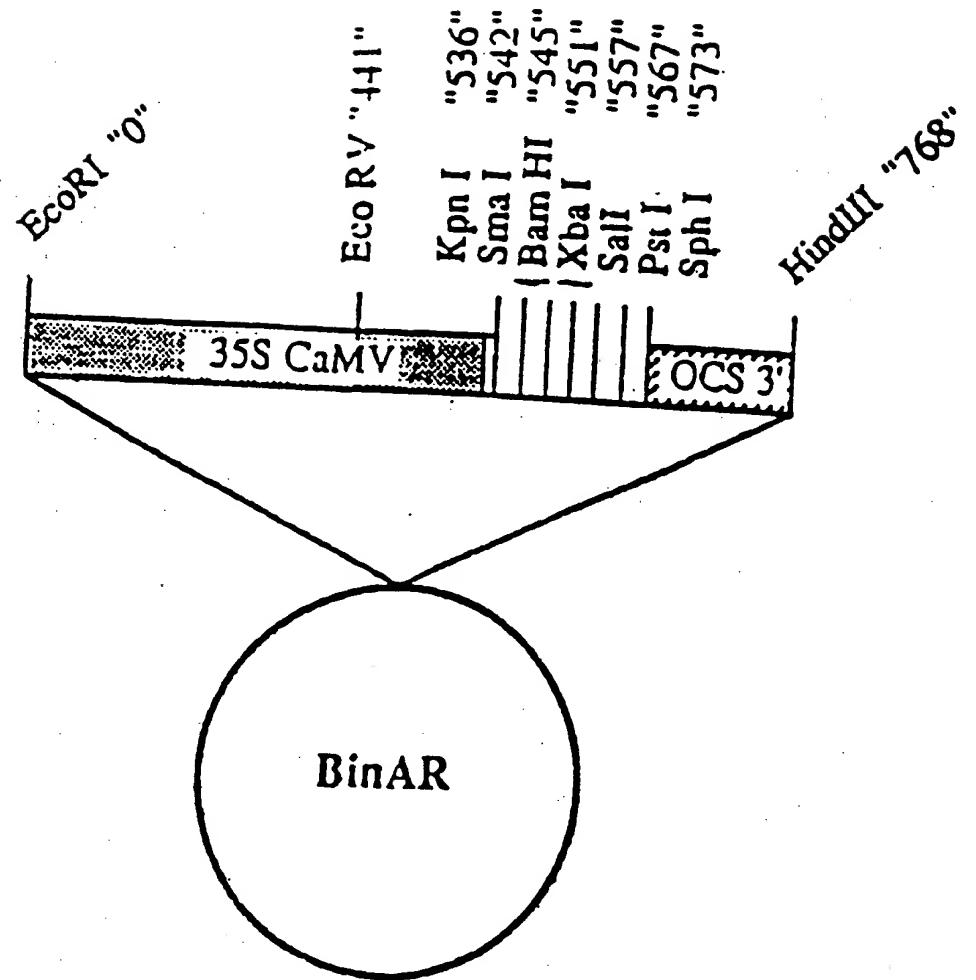
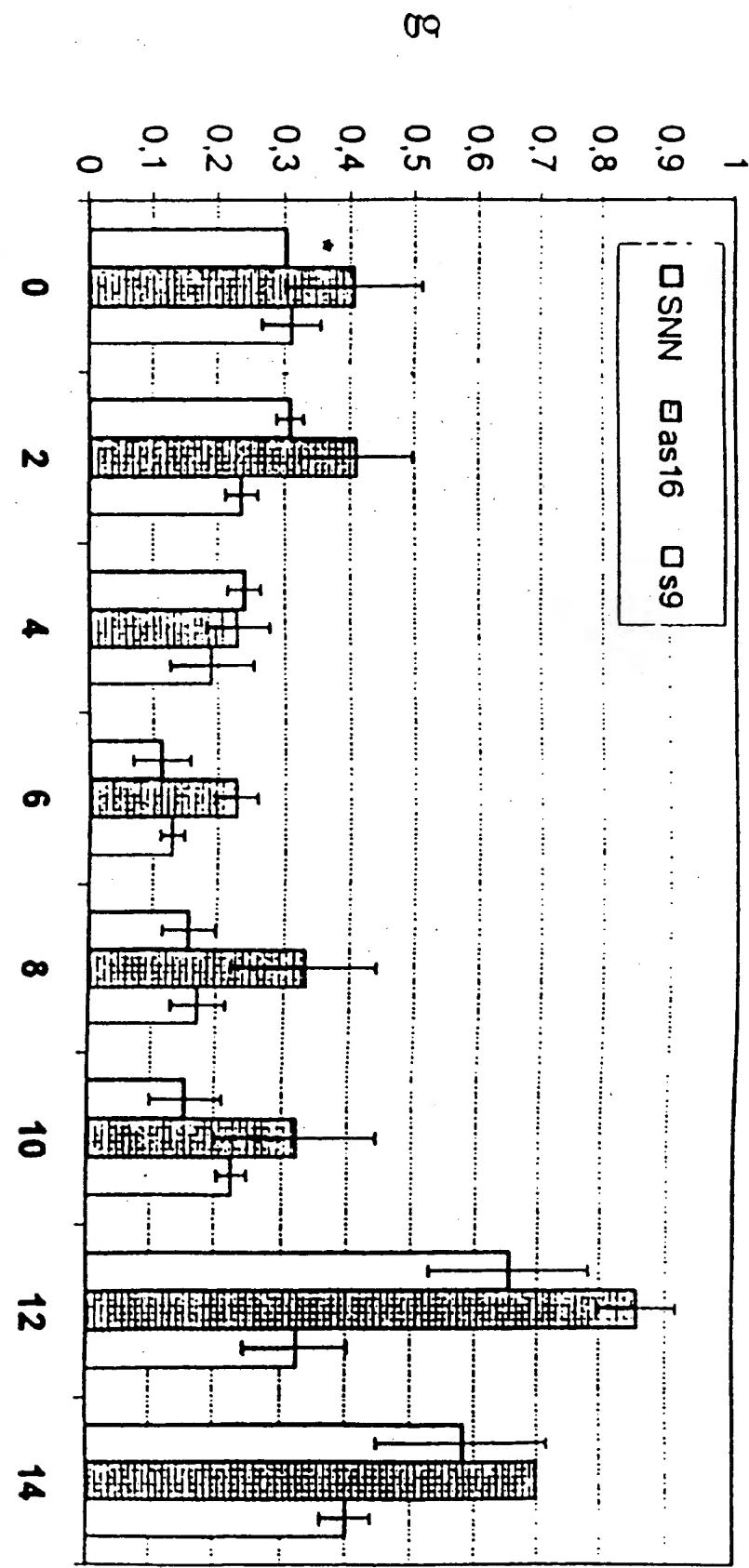


Fig. 2

11.09.22.98

Fig. 3



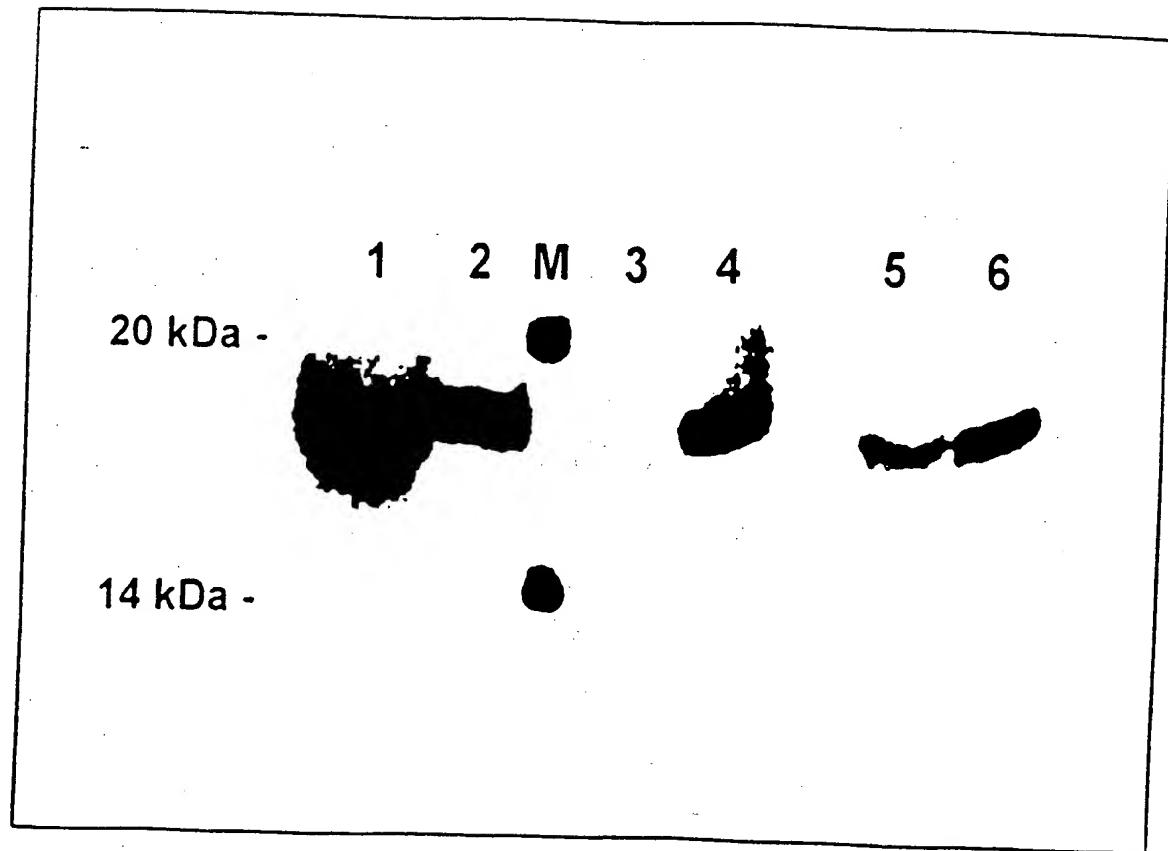


Fig. 4

d

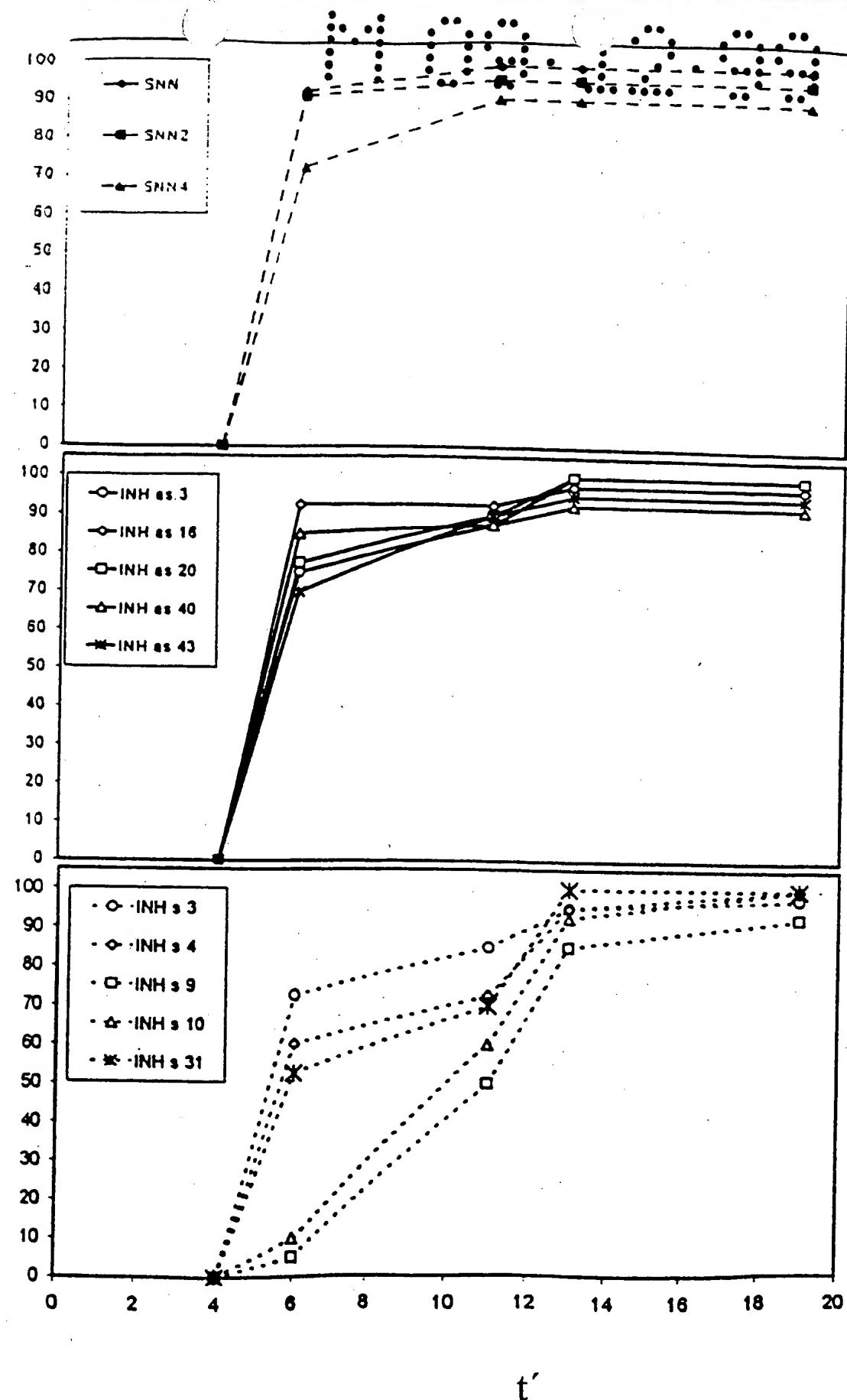


Fig. 5